

**UNTERSUCHUNGEN AN
MENSCHLICHEN IMMUNGLOBULIN - GENEN :
Feinkartierung und Subklonierung flankierender
Abschnitte der J_K-C_K-Region**

GIAN DOMENICO BORASIO

1984

Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Physikalische
Biochemie und Zellbiologie der Universität München

Vorstände: Prof. Dr.rer.nat. M. Klingenberg
Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. W. Neupert
Prof. Dr.rer.nat. H.G. Zachau
N.N.

Untersuchungen an menschlichen Immunglobulin-Genen:
Feinkartierung und Subklonierung flankierender Abschnitte
der J_κ-C_κ-Region

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gian Domenico Borasio
aus
Novara
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: .. Prof. Dr. H.G. Zachau

Mitberichterstatter: .. Prof. Dr. W. Neupert

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: .. Dr. H.-G. Klobeck

Dekan: .. Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: .. 18.12.1986

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von November 1982 bis Juli 1983.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau sage ich Dank dafür, daß ich diese Arbeit unter seiner Anleitung anfertigen durfte. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.-G. Klobeck und Frau Gabriele Combriato für ihre Unterstützung und für zahlreiche Diskussionen während der Durchführung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse	4
2.1. Kartierung von pJ-1	4
2.2. Feinkartierung von puJ-2	7
2.3. Kartierung mittels radioaktiver Endmarkierung	9
2.4. Eingrenzung der repetitiven Sequenz	17
2.5. Herstellung von M13-Subklonen	20
3. Diskussion	23
3.1. Mögliche Bedeutung der repetitiven Sequenz	23
3.2. M13-Subklone	24
3.3. Die menschliche J_k - C_k -Region in der Keimbahnordnung	25
4. Materialien und Methoden	27
4.1. Materialien	27
4.1.1. Reagenzien und Enzyme	27
4.1.2. Bakterien, Phagen und Nukleinsäuren	27
4.2. Methoden	28
4.2.1. Restriktionsspaltungen	28
4.2.2. Radioaktive Endmarkierung	28
4.2.3. Herstellung des Marker-Gemisches	28
4.2.4. Agarosegel-Elektrophorese	30
4.2.5. Southerntransfer und Filterhybridisierung	30
4.2.6. Transformation und Transfektion	31
4.3. Biologische Sicherheit	32
5. Zusammenfassung	33
6. Literaturverzeichnis	35
7. Abkürzungsverzeichnis	39



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554611_0008

1. Einleitung und Problemstellung

Höhere Organismen, wie Mensch oder Maus, sind in der Lage, sich gegen in den Körper eingedrungene Fremdstoffe - Antigene - zu verteidigen. Dazu dienen unter anderem die von differenzierten Zellen des Abwehrsystems, den B-Lymphozyten, sezernierten Proteine, welche als Antikörper oder Immunglobuline bezeichnet werden. Die Vielfalt des Antikörperaufgebots eines Organismus wird auf 10^6 bis 10^7 verschiedene Immunglobuline geschätzt (57). Dies ermöglicht dem Immunsystem, für praktisch jede Substanz den passenden Antikörper parat zu haben; man kann sogar annehmen, daß selbst für Substanzen, die erst in Zukunft hergestellt werden, die entsprechenden Immunglobuline existieren. Diese Flexibilität und Variabilität des Immunsystems hängt mit der besonderen Struktur der Antikörperproteine zusammen: diese sind aus je zwei leichten (L) und zwei schweren (H) Ketten aufgebaut, welche sich mit ihrem variablen (V), aminoterminalen Teil zur antigenbindenden Region und mit ihrem konstanten (C), carboxylterminalen Teil zu einer Region mit Effektorfunktion zusammenfalten. W.J. Dreyer und J.C. Bennett (14) postulierten erstmals, daß die beiden Regionen in voneinander unabhängigen Gensegmenten kodiert und während der Lymphozytenreifung zusammengeschaltet werden. Dabei stehen wenigen C-Segmenten eine Vielzahl von V-Segmenten gegenüber. Dieses Postulat, welches auf Vergleichen von Aminosäuresequenzen leichter Ketten untereinander beruhte, konnte mit Hilfe der Methoden der DNA-Neukombination, DNA-Sequenzierung und Hybridisierung bestätigt und verfeinert werden (32, 41). Es zeigte sich, daß drei Genfamilien für die Immunglobuline kodieren: zwei (L_K und L_λ) für die leichten und eine (H) für die schweren Ketten. Die Gene für die L_K -, L_λ - und H-Ketten befinden sich beim Menschen auf den Chromosomen 2, 22 bzw. 14 (10, 18, 30, 34). Bei den leichten Ketten liegen drei verschiedene Typen von Gensegmenten vor: V_L -, J_L - und

C_L-Segmente (8, 32, 41), während man bei den schweren Ketten vier findet (V_H, D, J_H, C_H) (15, 16).

B-Lymphozyten zeigen zwei Arten von DNA-Umlagerungen: Erstens werden die V_H-, D-, J_H- bzw. die V_L- und J_L-Gensegmente zu vollständigen V_H- bzw. V_L-Segmenten zusammengeschaltet (11, 42). Die zweite Umlagerung tritt ein, wenn eine B-Zelle, welche zuerst IgM-Moleküle erzeugt, auf die Expression anderer Immunglobuline umschaltet (z.B. IgA oder IgG). Dabei wird ein C_μ-Segment durch ein anderes C_H-Gensegment ersetzt, ohne daß sich die Antigen-spezifizität des Immunglobulins ändert (25, 31).

Was die relative Häufigkeit betrifft, überwiegen beim Menschen die leichten Ketten vom Typ κ mit etwa 65% aller V_L-Ketten (49). Andererseits scheint die Human-V_κ-Genfamilie mit nur vier Subgruppen und einer geschätzten Zahl von 15-20 V_κ-Genen (4) gegenüber jener des Mausgenoms (50 Subgruppen und 300 Gene nach Valbuena et al. (55)) wesentlich einfacher strukturiert zu sein. Klobeck et al. (28) haben allerdings gezeigt, daß zur geschätzten Zahl der menschlichen V_κ-Gene ungefähr die Hälfte durch V_κ-II-Gene hinzukommt, welche mit den bisherigen Hybridisierungsproben nicht erfaßt wurden.

Es gab bisher im wesentlichen zwei Theorien über die genetische Basis der Antikörpervielfalt. Beiden gemeinsam ist folgende Annahme: Die Zahl der Antikörper, die durch freie somatische Rekombination der V-Gensegmente mit J- und C-Gensegmenten während der Lymphozytendifferenzierung entstehen (44, 54), wird durch die Variabilität des genauen Rekombinationsortes zwischen V und J (33, 56) wie auch durch die verschiedene Zusammenlagerung leichter und schwerer Ketten erhöht. Die Keimbahntheorie besagte, daß jedes exprimierte V-Gen in der Keimbahn vorhanden sei, während die somatische Mutationstheorie wenige Keimbahngene postulierte, welche durch somatische Mutation während der Reifung der Lymphozytenzelle

eine hohe Anzahl verschiedener Antikörper ergeben würden.

Die letzten Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet (2, 7, 38 und Übersichtsartikel 26, 54) sprechen bei der Maus beiden Mechanismen eine Rolle zu: trotz der großen Anzahl von V-Segmenten im Mausgenom, die allein ausreichen würden, um das ganze Antikörperrepertoire nach der Keimbahntheorie hervorzubringen, wurden aus differenzierten Zellen Sequenzen isoliert, die durch somatische Mutation aus Keimbahngenen hervorgegangen sein müssen. Es ist aber anzunehmen, daß der Anteil der beiden Mechanismen an der Entstehung der Antikörperdiversität von Spezies zu Spezies verschieden ist. Die im Vergleich zur Maus niedrige (geschätzte) Zahl der menschlichen V_K -Gene (4) könnte etwa auf eine größere Rolle der somatischen Mutationen im Entstehungsprozeß der Antikörpervielfalt beim Menschen hindeuten.

In diesem Zusammenhang ist es unter anderem von Interesse, die Immunglobulin-Gensegmente und ihre flankierenden DNA-Abschnitte in der Keimbahnanordnung sowie nach erfolgter Umlagerung zu untersuchen. Ein Vergleich dieser Ergebnisse könnte zum Verständnis des somatischen Rekombinationsprozesses beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Struktur des Lokus für die fünf J_K - und dem C_K -Gensegment des Menschen in der Keimbahnanordnung näher untersucht werden. Das Vorhandensein einer repetitiven Sequenz in der 5'-Flanke von J_K-1 (H.-G. Klobeck, pers. Mitt.) machte eine Feinkartierung dieses DNA-Abschnittes und eine Eingrenzung der Sequenz notwendig. Eine funktionelle Bedeutung dieser Sequenz, wie sie auch für verschiedene Familien repetitiver Sequenzen aus Säugtiergenomen diskutiert wird. (12, 19, 45, 48), kann nicht ausgeschlossen werden.

Schließlich sollten aus dem Klon, welcher den menschlichen J_K-C_K -Lokus enthält, Subklone im Vektor M13mpl0 für Chromatinstudien und eventuelle Sequenzierungen hergestellt werden.

2. Ergebnisse

G. Combriato und H.-G. Klobeck konnten mit Hilfe eines die J_K -Region aus Mäuse-DNA enthaltenden Subklons ein BamHI-Fragment aus menschlicher DNA anreichern. Ein rekombinanter Charon 30-Phage enthielt ein 10,6 kb langes DNA-Fragment, auf dem sowohl die J_K -Region als auch das C_K -Gensegment aus dem menschlichen Genom liegen. Die Restriktionskarte dieses klonierten DNA-Fragments entsprach der von Hieter et al. (22, 23) für den J_K - C_K -Lokus des menschlichen Genoms angegebenen (Abb. 1).

Subklone aus verschiedenen Bereichen des 10,6 kb langen BamHI-Fragments wurden in pBR322 (6) und pCK19 hergestellt (pCK19 wurde aus pBR322 durch den Einbau einer SstI-Spaltstelle anstatt der HindIII-Spaltstelle an Position 29 hergestellt - G. Combriato, pers. Mitt.). Die Subklone pJ-1 und puJ-2 wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Zunächst sollte die J_K -Region mit verschiedenen Restriktionsnukleasen genauer kartiert werden.

2.1. Kartierung von pJ-1

Die Auswahl der zur Kartierung benutzten Restriktionsnukleasen erfolgte unter zwei Gesichtspunkten. Einerseits sollten die Nukleasen eine überschaubare Anzahl von Spaltfragmenten liefern, andererseits sollten solche Nukleasen verwendet werden, deren Spaltfragmente für Subklonierungen in pBR322 oder M13-Vektoren eingebaut werden können. Deswegen wurden folgende Restriktionsnukleasen ausgewählt: AccI, HincII, PstI und PvuII. Jedes dieser Enzyme besitzt eine durch sechs Nukleotide festgelegte Erkennungssequenz; die theoretische Spalthäufigkeit liegt für AccI und HincII bei 1/2011 Bp, für PstI und PvuII bei 1/6499 Bp (ausgehend von einem GC-Gehalt der DNA von 40,5%).

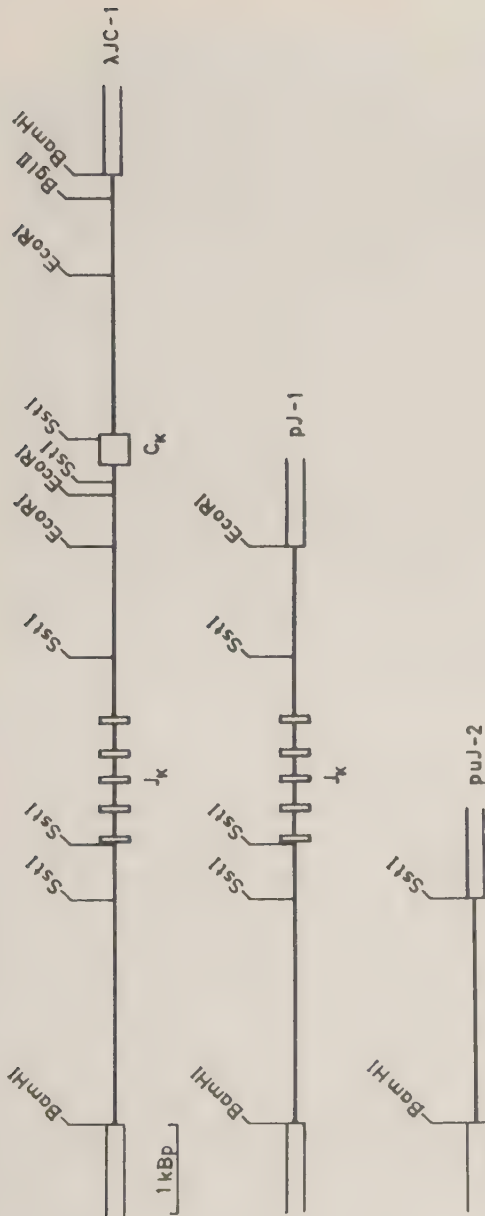


Abb. 1: Partielle Restriktionskarte von lambdaJC-1, pJ-1 und pUJ-2

Der lambda-Klon lambdaJC-1 umfaßt ein 10,6 kb langes BamHI-Fragment mit der menschlichen J_K-C_K -Region. Der Subklon pJ-1 (eingebautes Fragment: 6,44 kb) enthält die fünf J_K -Gene, die über 1,44 kb verteilt sind, sowie 3,1 kb 5'-seitig von J_K-1 und 1,9 kb 3'-seitig von J_K-5 . Der Subklon pUJ-2 umfaßt 2,5 kb und endet 0,6 kb 5'-seitig von J_K-1 . Gensegmente (J_K, C_K) sind als geschlossene, die Vektorarme als offene Balken eingezeichnet.

Jeweils ein μg DNA wurde mit je einem der vier Enzyme gespalten und die Proben auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Aus der Anzahl der durch Spaltung mit einem Enzym erhaltenen Banden ergab sich die Anzahl der Spaltstellen für jede Restriktionsnuklease. Die Größe der Fragmente konnte durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Länge (Marker-Gemisch) ermittelt werden.

Die Spaltstellen der verwendeten Enzyme in pBR322 sind bekannt (51, 52). Daher reichte für die in der zu kartierenden DNA nur einmal spaltenden Enzyme (PstI und PvuII) jeweils eine gezielte Doppelspaltung, um eine eindeutige Zuordnung der Spaltstellen vorzunehmen. Für AccI und HincII waren mehrere Doppelspaltungen notwendig, wobei in einem Fall zwischen zwei möglichen Lokalisierungen einer Spaltstelle von AccI nicht eindeutig entschieden werden konnte. Abb. 2 zeigt die auf diese Weise erstellte erweiterte Restriktionskarte von pJ-1.

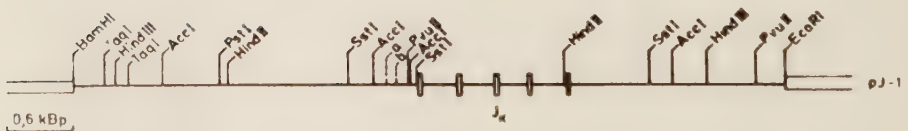


Abb. 2: Erweiterte Restriktionskarte von pJ-1

a und b bezeichnen die beiden möglichen Positionen einer nicht eindeutig kartierbaren AccI-Spaltstelle.

2.2. Feinkartierung von puJ-2

Hybridisierungsexperimente mit radioaktiv markierter Gesamt-DNA aus menschlicher Plazenta hatten ergeben, daß sich auf pJ-1 eine repetitive Sequenz befindet. In ersten Experimenten konnte gezeigt werden, daß sich die Sequenz im 5'-Bereich von pJ-1, und zwar innerhalb von puJ-2, befinden mußte (H.-G. Klobeck, pers. Mitt.). Die Lage dieser repetitiven Sequenz sollte möglichst genau bestimmt werden.

Es galt nun, den Subklon puJ-2 sehr genau zu kartieren und die repetitive Sequenz einzugrenzen. Dabei wurde zunächst wie unter 2.1. beschrieben verfahren. Verwendet wurde die Restriktionsnuklease TaqI, die eine durch vier Nukleotide festgelegte Erkennungssequenz aufweist. Die Erkennungssequenz von TaqI enthält allerdings die Nukleotidabfolge CpG, die in eukaryontischer DNA viel seltener vorkommt, als nach statistischer Verteilung zu erwarten ist (40). Dementsprechend liegt auch die Spalthäufigkeit von TaqI in eukaryontischer DNA weit unter dem theoretischen Wert von 1/267 Bp (berechnet wie unter 2.1. beschrieben).

Mit Hilfe der bekannten TaqI-Spaltfragmente aus pBR322 konnten in puJ-2 zwei zusätzliche Spaltstellen gefunden werden. Um diese eindeutig einzuordnen, wurden Doppelspaltungen mit sämtlichen anderen Restriktionsnukleasen notwendig, deren Spaltstellen in puJ-2 bekannt waren (Abb. 3). Bei noch häufiger spaltenden Nukleasen wäre wegen der gleichzeitig wachsenden Zahl der pBR322-Spaltstellen und der Fragmente ähnlicher Größe um 200-300 Bp ein völlig unüberschaubares Bild zu erwarten gewesen. Das hätte zu Schwierigkeiten bei der Größenbestimmung und Zuordnung der Restriktionsfragmente auf Agarosegelen geführt. Deshalb wurde eine andere Kartierungsmethode in Angriff genommen.

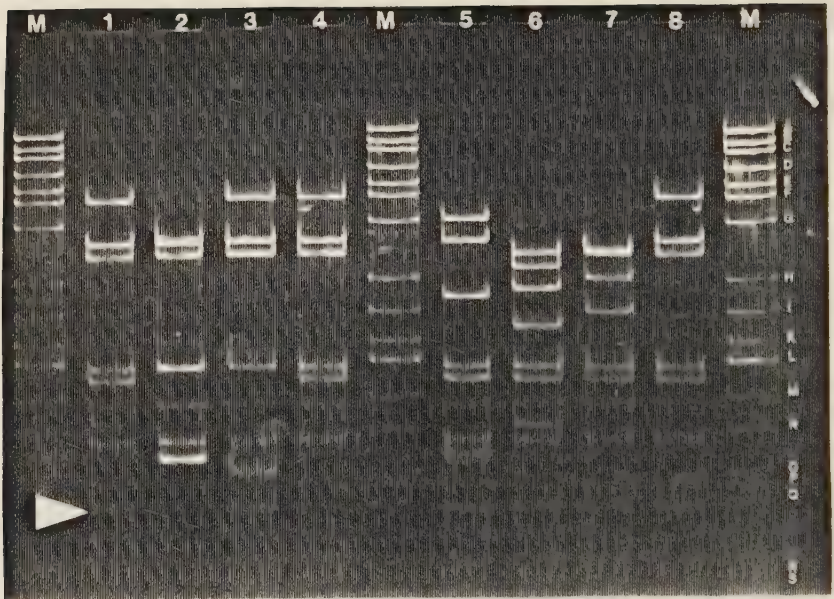


Abb. 3: Doppelspaltungen zur Kartierung zweier TaqI-Spaltstellen in puJ-2

Der Subklon puJ-2 wurde mit folgenden Enzymen gespalten (in Klammern die Bahn, auf welche das Spaltgemisch aufgetragen wurde): TaqI (1), TaqI/BamHI (3), TaqI/HindIII (4), TaqI/AccI (5), TaqI/PstI (6), TaqI/HincII (7), TaqI/SstI (8). Auf Bahn 2 wurde eine Kontrollspaltung von pBR322 mit TaqI, auf die mit "M" bezeichneten Bahnen ein Markergemisch aufgetragen.

Das mit einem Pfeil markierte 210 Bp-Fragment entspricht dem Abschnitt zwischen den beiden TaqI-Spaltstellen. Es wird von der Nuklease HindIII in zwei kleinere Fragmente von 100 bzw. 110 Bp Länge gespalten.

Für die Längen der mit A-S bezeichneten Fragmente des Markergemisches siehe unter 4.2.3..

2.3. Kartierung mittels radioaktiver Endmarkierung

Beim Subklon puJ-2 beginnt das eingebaute menschliche DNA-Fragment mit seinem 3'-Ende an der SstI-Spaltstelle und endet mit seinem 5'-Ende an der BamHI-Spaltstelle von pCK19. Zum Einbau der menschlichen DNA in pCK19 war eine Deletion von 246 Bp des Vektors notwendig. Wie aus Abb. 4 ersichtlich, liegen im Vektor pCK19 die Spaltstellen der Enzyme EcoRI, ClaI und SstI sehr eng beieinander, innerhalb von 29 Bp. Diese Konstellation ermöglicht das im folgenden beschriebene Verfahren, das von W. Hörz nach einer von M. Birnstiel (46) beschriebenen Kartierungstechnik modifiziert wurde (W. Hörz, pers. Mitt.).



Abb. 4: Partielle Restriktionskarte vom Subklon puJ-2

Die für die im Text beschriebene Kartierungsmethode wichtigen Spaltstellen sind unterstrichen.

Präparationen von Plasmid-DNA enthalten einen Anteil an niedermolekularer DNA und RNA, die aus dem Wirtsgenom von Escherichia Coli stammen. Bei einer radioaktiven Endmarkierung stellen diese Moleküle eine große Anzahl von Enden zur Verfügung und konkurrieren mit der Plasmid-DNA um die radioaktiven Nukleotide, wodurch die Ausbeute der Endmarkierung erheblich verringert wird. Zudem stören diese radioaktiv markierten niedermolekularen DNA-Fragmente

in erheblichem Maße bei der Auswertung des unten beschriebenen Verfahrens, bzw. machen eine Auswertung oft unmöglich.

Um dem vorzubeugen, wurde die DNA mittels der Passage durch eine Sephacryl S 1000-Säule gereinigt. Die DNA war dabei in folgendem Puffer aufgelöst, mit welchem auch die Säule äquilibriert worden war: 0,2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=8,0, 0,1 mM EDTA. Die optische Dichte der Fraktionen wurde bei 260 nm gemessen und in einem Graph eingetragen (Abb. 5). Gleiche Teile der Fraktionen wurden auf einem Agarosegel aufgetragen (nicht gezeigt), wodurch die gereinigte Plasmid-DNA in den Fraktionen des ersten flachen Gipfels lokalisiert werden konnte. Diese Spitzenfraktionen wurden vereinigt. Durch Summierung der optischen Dichte dieser Fraktionen konnte man die Menge an gereinigter DNA abschätzen, die für den weiteren Verlauf zur Verfügung stand. Sie betrug ca. 10% der durch die Säule geschleusten DNA-Menge, d.h. ca. 10 µg.

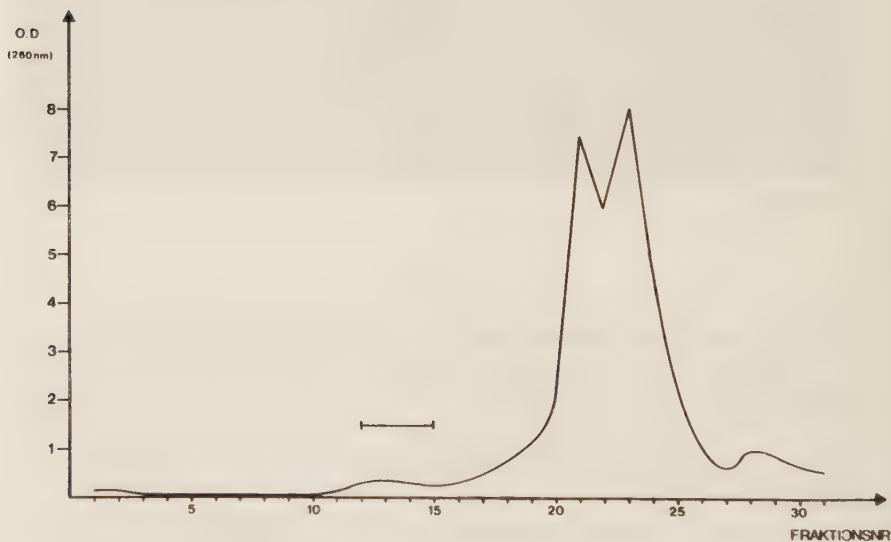


Abb. 5: Graph der OD-Messung der fraktionierten Plasmid-DNA

100 µg DNA wurden über eine Sephacryl S 1000-Säule gereinigt. Jeweils 500 µl-Fraktionen des Eluats wurden gesammelt und die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Nach einer Gelkontrolle wurden die Fraktionen 12-15 vereinigt und für den weiteren Verlauf benutzt. Gemessen wurde mit einem Photometer der Firma Carl Zeiss, Oberkochen.

Die gereinigte DNA wird nun vollständig mit der Restriktionsnuklease ClaI gespalten, welche im gesamten Subklon nur eine Spaltstelle besitzt. Somit wird die DNA linearisiert. Auf Grund der Spalteigenschaften von ClaI bleiben 5'-überhängende Enden bestehen (Abb. 6). Diese Enden werden, unter Verwendung von DNA Polymerase I (großes Fragment nach Klenow) mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{F}]\text{dCTP}$ partiell aufgefüllt. Die DNA wird dadurch an beiden Enden radioaktiv markiert. Um die Plasmid-DNA von den nicht eingebauten radioaktiven Mononukleotiden zu trennen, wird eine Sephadex G50-Säule benutzt. Die markierte DNA läuft schneller durch die Säule als die Mononukleotide und kann dadurch von diesen abgetrennt werden. Die Radioaktivität der Fraktionen wird gemessen, und wiederum der erste Gipfel, bestehend aus 3-5 Fraktionen, weiterverarbeitet. Die Summe der Radioaktivitäten dieser Fraktionen gibt Auskunft über die Ausbeute der Endmarkierung.

Nach Zusatz von Magnesium-Ionen wird die DNA vollständig mit der Nuklease EcoRI gespalten. Dabei wird ein 23 Bp langes Stück abgespalten, sodaß die beiden entstehenden Fragmente jeweils an einem Ende radioaktiv markiert sind. Die Markierung am großen Stück, das die eingebaute DNA enthält, befindet sich 6 Bp von der Sst-Insertionsstelle entfernt.

Das Enzym EcoRI wird hitzeinaktiviert (10 min bei 65°C) und es werden Partialsplattungen mit häufig spaltenden Restriktionsnukleasen durchgeführt. Die Bedingungen werden so gewählt, daß die Splattungen keine Endmuster liefern. Es sind vielmehr alle möglichen Fragmente zwischen zwei beliebigen Spaltstellen des betreffenden Enzyms bzw. zwischen einer solchen Spaltstelle und einem Ende der DNA zu erwarten.

Verwendet wurden folgende Enzyme: AluI, BspRI, HinfI, HpaII, HphI, Sau3AI, Sau96I. Diese Nukleasen besitzen eine durch vier Nukleotide

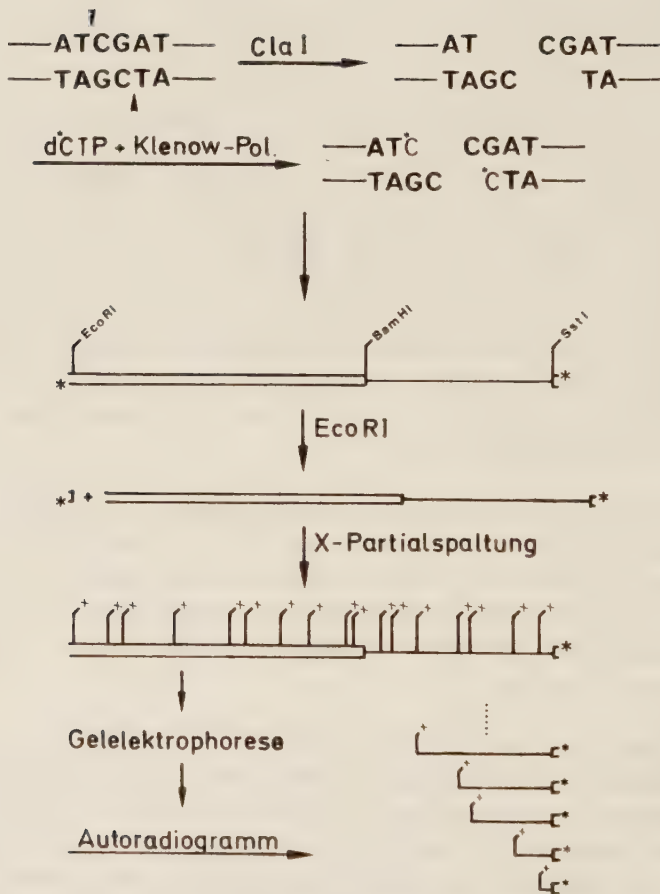


Abb. 6: Schema der Kartierungsmethode mit häufig spaltenden Restriktionsnukleasen durch *Cla*I-Spaltung und radioaktive Endmarkierung. Erläuterung im Text.

Klenow-Pol.: DNA Polymerase I, großes Fragment nach Klenow

festgelegte Erkennungssequenz (mit Ausnahme von HphI, das eine 5er-Erkennungssequenz aufweist). Ihre theoretische Spalthäufigkeit liegt bei 1/267 Bp (AluI, HinfI, Sau3AI), 1/595 Bp (BspRI, HpaII, Sau96I) bzw. 1/1316 Bp (HphI). Bei HpaII wird diese Häufigkeit zusätzlich durch das Vorkommen der Nukleotidabfolge CpG in der Erkennungssequenz reduziert (s. auch 2.2.).

Die Spaltfragmente werden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Gleichzeitig aufgetragen wird ein Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Größe. Die DNA wird dann vom Gel auf ein Nitrozellulosefilter übertragen (47) und ein Autoradiogramm vom Filter hergestellt (Abb. 7a,b).

Bei einer Partialspaltung mit einem Enzym, welches in der linearisierten DNA n Spaltstellen besitzt, sind bis zu $((n+1)(n+2))/2$ verschiedene Fragmente zu erwarten. Bei einer Spalthäufigkeit von 1/267 Bp sind auf einer Länge von 6616 Bp (puJ-2) ungefähr 25 Spaltstellen anzunehmen; das dazugehörige Partialmuster würde dann bis zu 351 verschiedene Fragmente aufweisen. Dementsprechend sind die Partialmuster auf den Agarosegelen für eine Kartierung nicht verwertbar. Bei der Autoradiographie kommen hingegen nur diejenigen Fragmente zum Vorschein, die radioaktiv markiert sind. Das 23 Bp lange markierte Stück läuft auf Grund seiner geringen Größe unten aus dem Gel heraus und ist damit nicht mehr sichtbar. Die unterste Bande im Autoradiogramm entspricht somit dem kleinstmöglichen radioaktiv markierten Fragment aus dem langen DNA-Abschnitt: von dem markierten Ende bis zur ersten Spaltstelle des betreffenden Enzyms in der eingebauten DNA. Das nächstgrößere Fragment entspricht dann dem Fragment vom markierten Ende bis zur zweiten Spaltstelle des Enzyms in der eingebauten DNA, und so weiter. Diese Banden sind, nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid, auf dem Agarosegelphoto so schwach, daß sie nicht identifizierbar sind; nur die hohe Sensitivität der Autoradiographie zusammen

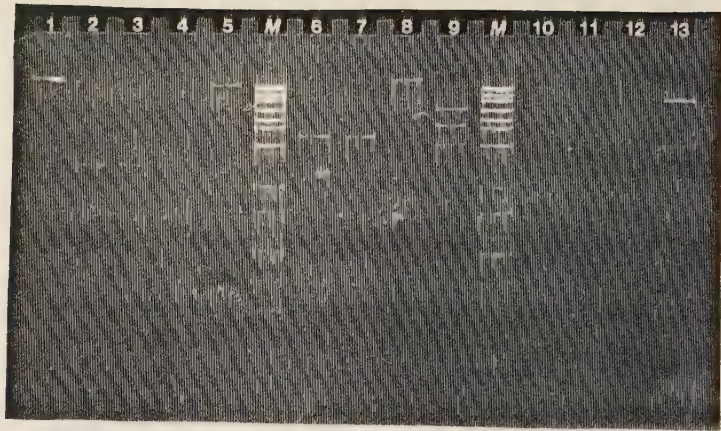


Abb. 7a: Agarosegelelektrophorese und Autoradiogramm zur Kartierung mittels radioaktiver Endmarkierung

Jeweils 0,5 µg DNA wurden (a) mit einer für ein Endmuster gerade ausreichenden Enzymmenge sowie (b) mit 1/10 und (c) mit 1/100 dieser Menge versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Bahnen, aus denen die Restriktionsspaltstellen ermittelt wurden, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Enzymverteilung auf den Bahnen war wie folgt: 1 - ClaI/EcoRI, 2 - Sau3A (a), 3 - Sau3A (b), 4 - Sau3A (c), 5 - HindIII, 6 - BspRI (a), 7 - BspRI (b), 8 - BspRI (c), 9 - AccI, 10 - HinfI (a), 11 - HinfI (b), 12 - HinfI (c), 13 - HincII, M - Markergemisch (1, 5, 9, 13: Kontrollspaltungen).

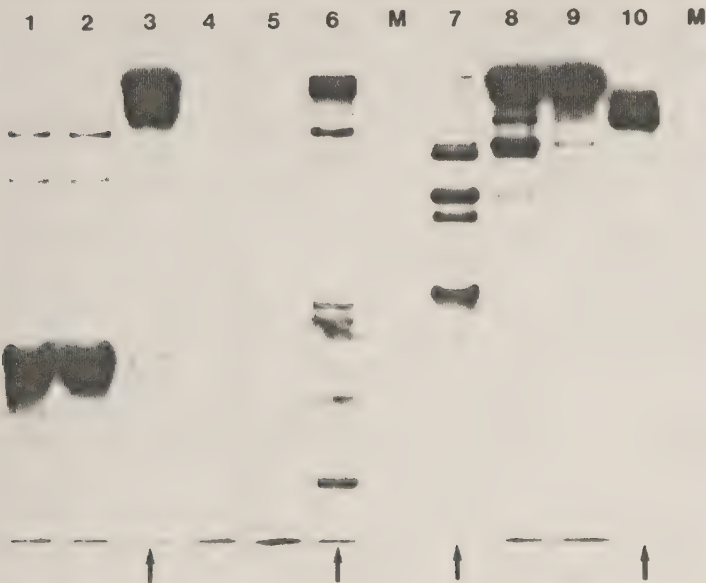
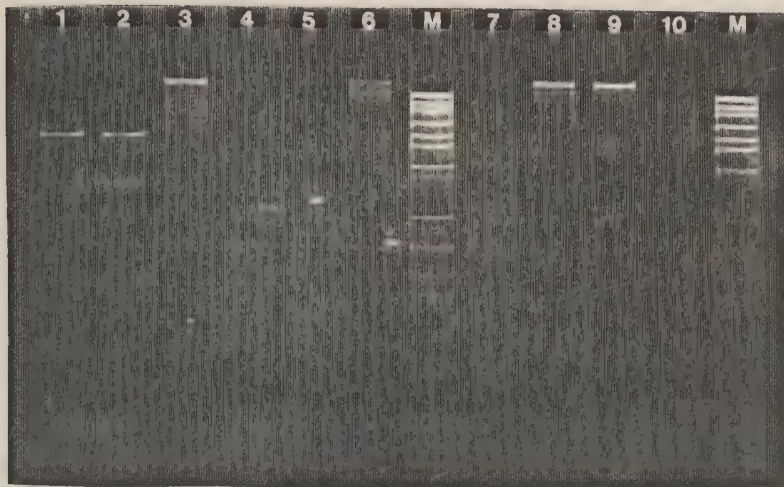


Abb. 7b: Agarosegelelektrophorese und Autoradiogramm zur Kartierung mittels radioaktiver Endmarkierung

Die Partialsplattungen erfolgten wie in der Legende zu Abb. 7a beschrieben. Die Bahnen, aus denen die Restriktionsspaltstellen ermittelt wurden, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Enzymverteilung auf den Bahnen war wie folgt: 1 - Sau96I (a), 2 - Sau96I (b), 3 - Sau96I (c), 4 - AluI (a), 5 - AluI (b), 6 - AluI (c), 7 - HphI (a), 8 - HphI (b), 9 - HphI (c), 10 - HpaII (c), M - Markergemisch.

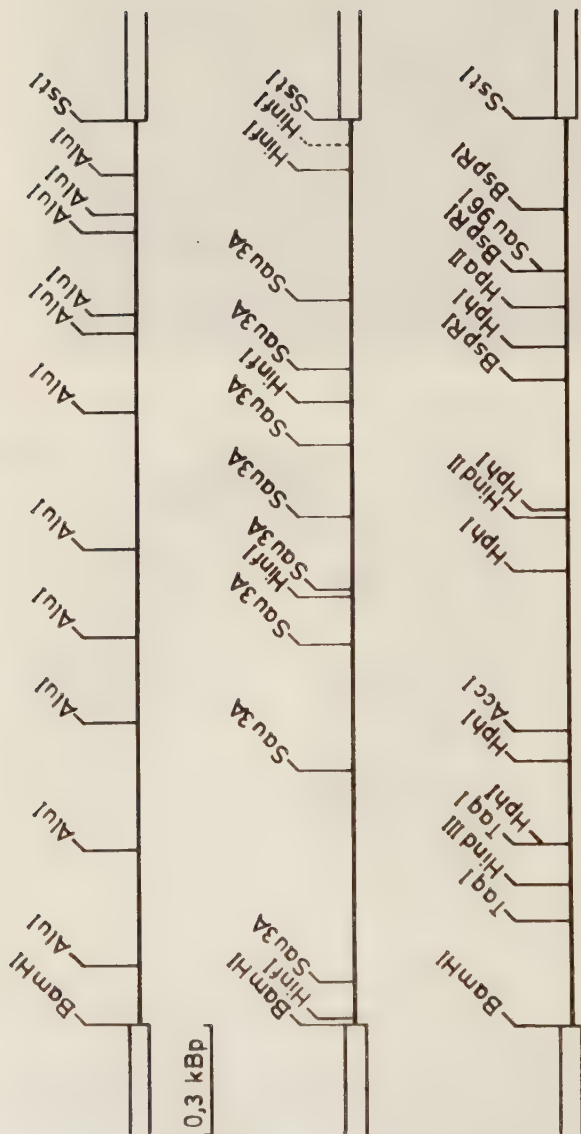


Abb. 8: Restriktionskarte von puJ-2 nach Feinkartierung.

Der Übersichtlichkeit halber wurde der Subklon dreimal, mit Spaltstellen von jeweils verschiedenen Enzymen, aufgezeichnet. Die Genauigkeit der Kartierung läßt sich mit ca. ± 10 Bp abschätzen. Die absolute Genauigkeit nimmt von 3' nach 5' leicht ab, weil die betreffenden radioaktiv endmarkierten Fragmente größer werden.

mit der Unsichtbarkeit der nicht markierten Fragmente ermöglichen die erfolgreiche Anwendung dieses Kartierungsverfahrens.

Die Bandenabstände wurden mit Hilfe des Vergrößerungsfaktors Autoradiogramm/Gelphoto zurückgerechnet und auf das Gelphoto bezogen. Durch Vergleich mit den Banden des Marker-Gemisches konnten die Längen der radioaktiven Fragmente bestimmt und die Spaltstellen in der Restriktionskarte von puJ-2 eingezeichnet werden (Abb. 8).

2.4. Eingrenzung der repetitiven Sequenz

Um die innerhalb von puJ-2 vermutete repetitive Sequenz weiter einzugrenzen, wurde folgendes Experiment durchgeführt: der Subklon wurde mit Kombinationen von jeweils zwei Nukleasen gespalten, welche je eine Spaltstelle innerhalb der eingebauten menschlichen DNA besitzen (damit nicht unüberschaubar viele Fragmente entstehen). Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf ein Nitrozellulosefilter transferiert (47) und mit radioaktiv markierter Gesamt-DNA aus menschlicher Plazenta hybridisiert. Wie aus dem Autoradiogramm des hybridisierten Filters im Vergleich zum Gelphoto zu erkennen ist (Abb. 9), hybridisieren sämtliche Fragmente, die von der AccI-Spaltstelle an Position 810 nach 3' ziehen, mit einer Ausnahme: bei der AccI-HincII Doppelspaltung gibt das 590 Bp lange Fragment zwischen AccI und HincII auf der genomischen DNA kein Hybridisierungssignal, wohl aber das 1585 Bp lange Fragment zwischen der HincII-Spaltstelle in Position 1400 auf der genomischen DNA und der HincII-Spaltstelle in Position 3906 auf pCK19. Daraus folgt, daß es keine hochrepetitive Sequenz auf der eingebauten DNA 5' der HincII-Spaltstelle zu geben scheint, und daß sich die gesuchte repetitive Sequenz im 1100 Bp langen Abschnitt des Subklons von der HincII- bis zur SstI-Spaltstelle befindet (Abb. 10).

Abb. 9: Legende siehe nächste Seite

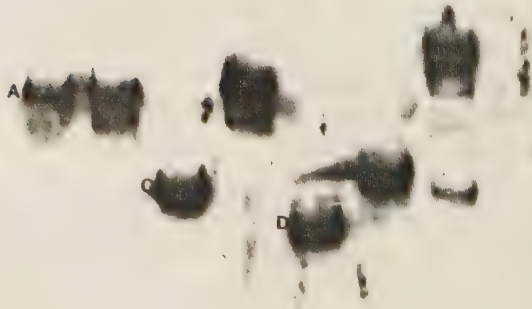
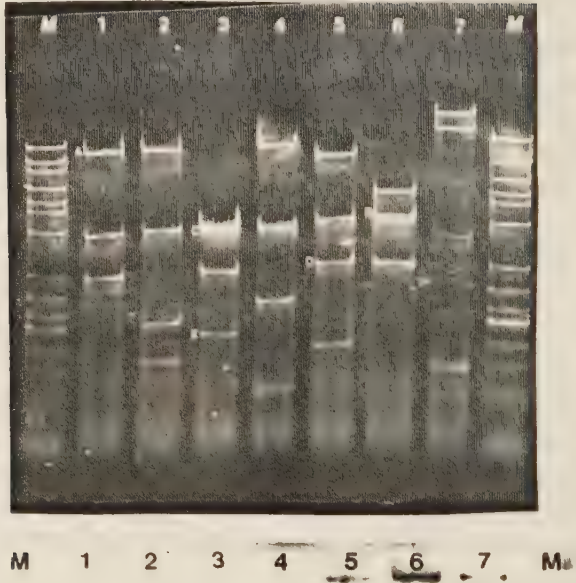


Abb. 9: Restriktionsspaltungen und Hybridisierung der Spaltprodukte vom Subklon puJ-2

Die Enzymverteilung auf den Bahnen war wie folgt: 1 - AccI, 2 - AccI/HindIII, 3 - AccI/HincII, 4 - AccI/BamHI, 5 - SstI/HincII, 6 - SstI/AccI, 7 - BamHI/HindIII. Die Restriktionsspaltungen wurden wie unter 4.2.1. beschrieben durchgeführt. Die mit Buchstaben markierten Fragmente entsprechen folgenden Abschnitten des Subklons (von 5' nach 3'; die Numerierung der Vektorbasen entspricht der von J.G. Sutcliffe (52) für den pHR322 angegebenen): A: Human-DNA 810 (AccI) - pCK19-DNA 2245 (AccI) = 3834 Bp; B: H 810 (AccI) - H 2500 (SstI) = 1690 Bp; C: H 1400 (HincII) - p 3906 (HincII) = 1585 Bp; D: H 1400 (HincII) - H 2500 (SstI) = 1100 Bp; X: H 810 (AccI) - H 1400 (HincII) = 590 Bp.

Aus der Tatsache, daß zwar A,B,C,D, aber nicht X, mit Gesamt-DNA aus menschlicher Plazenta hybridisieren, läßt sich die in puJ-2 vorhandene repetitive Sequenz auf Abschnitt D eingrenzen (siehe Text und Abb. 10).



Abb. 10: Partielle Restriktionskarte von puJ-2

Innerhalb des Subklons puJ-2 befindet sich eine repetitive Sequenz, welche durch Hybridisierungsexperimente auf den unterstrichenen Bereich (ca. 1100 Bp) eingegrenzt werden konnte. Die genaue Länge der repetitiven Sequenz ist noch unbekannt.

2.5. Herstellung von M13-Subklonen

Die Vektoren der M13mp-Serie (21) bieten verschiedene Vorteile gegenüber anderen üblichen Vektoren (s. auch 3.2.). Unter anderem sind M13-Subklone als Ausgangsmaterial für die von Sanger et al. (43) zuerst beschriebene Methode des Kettenabbruchs mit Dideoxynukleotiden zur Bestimmung einer DNA-Sequenz verwendbar. Diese Methode wurde von Messing et al. (35) für M13-Phagen ausgearbeitet. Für Hybridisierungsexperimente, bei denen keine pBR322-spezifischen Sequenzen in der Probe vorkommen dürfen, wie z.B. Hybridisierungen von Cosmid-Klonen, die pBR322-Sequenzen enthalten, sind M13-Subklone das Mittel der Wahl.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Fragmente aus dem pCK19-Klon pJ-1 in M13mp10 kloniert und präparativ angezüchtet. Die im folgenden beschriebene Methode wurde von G. Combriato (pers. Mitt.) entwickelt.

Die fraglichen DNA-Fragmente werden nach präparativer Spaltung mit den entsprechenden Nukleasen aus 0,8%igen Seaplaque-Agarosegelen isoliert. Nach Schmelzen der unter UV-Licht ausgeschnittenen Agarose-Bande in 1 M NaCl bei 65°C wird die Probe bei -20°C eingefroren, aufgetaut, und die Agarose abzentrifugiert. Der Überstand wird durch 3MM-Papier filtriert, der Agaroseniederschlag erneut mit 1 M NaCl extrahiert, abzentrifugiert und der Überstand erneut filtriert. Nach Äthanol-fällung und Zentrifugation wird der Niederschlag in Tris-Acetat-Puffer (100 mM Natriumacetat, 50 mM Tris-HCl pH=8,0) gelöst, 2 min bei 65°C erhitzt und die letzten Agarosepartikeln wieder abzentrifugiert. Nach Äthanol-fällung des Überstandes wird der Niederschlag in 100 µl Ligase-Puffer aufgenommen (70 mM Tris-HCl pH=7,5, 7 mM MgCl₂, 0,07 mM ATP). Die zu ligierenden Fragmente wurden vereinigt und 1 µl T4-DNA Ligase zugesetzt. Die Ligierungen erfolgten über Nacht bei 16°C und wurden elektrophoretisch überprüft. Transformation, Transfektion und

präparative Anzucht wurden wie unter 4.2.6. beschrieben durchgeführt. Die drei Subklone (Abb. 12) wurden vor und nach der präparativen Anzucht mittels Restriktionsspaltungen überprüft (Abb. 11).

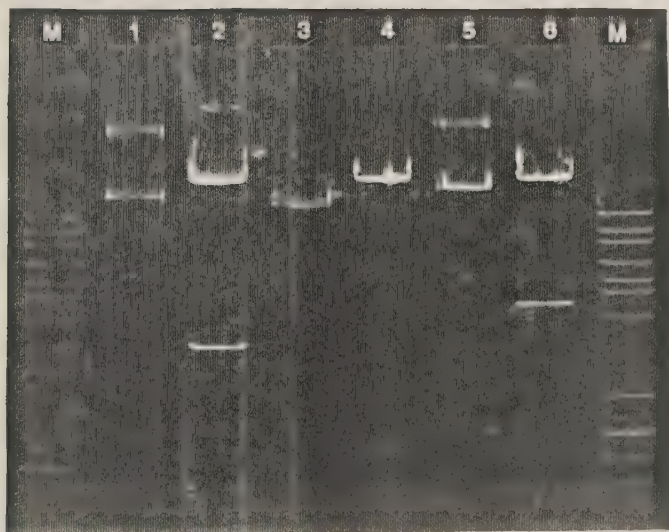


Abb. 11: Restriktionsspaltungen von M13mpl0-Subklonen

Die Bahnenverteilung ist wie folgt: 1 - muJ-3 ungespalten, 2 - muJ-3 gespalten mit BamHI und HincII, 3 - muJ-1 ungespalten, 4 - muJ-1 gespalten mit SstI, 5 - mJ-2 ungespalten, 6 - mJ-2 gespalten mit SstI, M - Markergemisch.

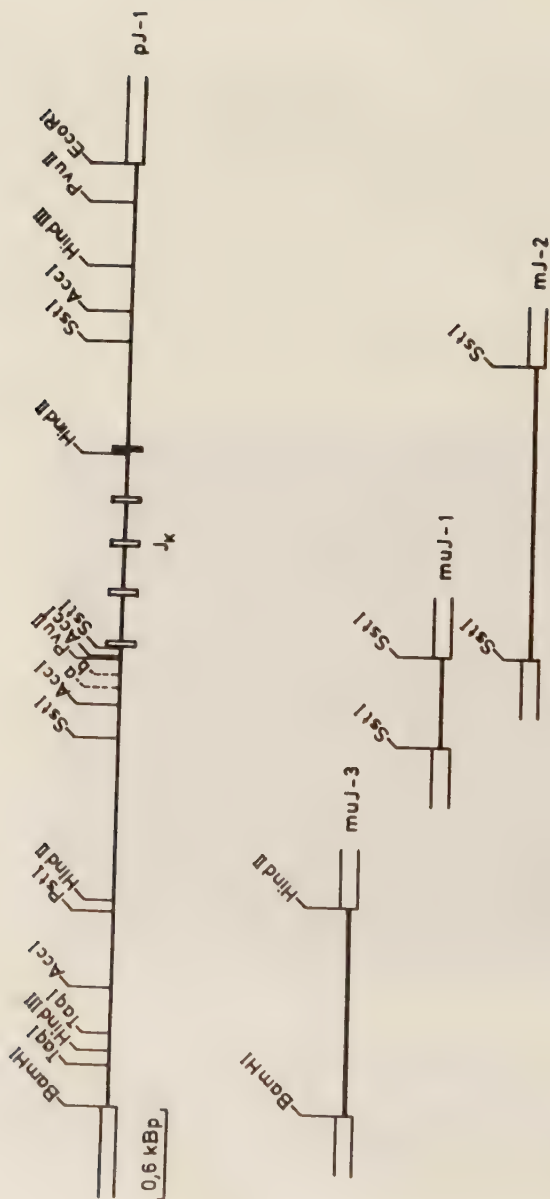


Abb. 12: Lage der drei MJ3mpl0-Subklone bezogen auf pJ-1
Die Länge der eingebauten DNA-Fragmente beträgt für muJ-3 1400 Bp, für muJ-1 620 Bp und für muJ-2 1850 Bp.

3. Diskussion

3.1. Mögliche Bedeutung der repetitiven Sequenz

Die Analyse von Säugetiergenomen auf DNA-Ebene hat bisher eine komplexe Vielfalt hochrepetitiver Sequenzen ($>10^4$ Kopien per haploides Genom) zum Vorschein gebracht. Das bekannteste Beispiel stellen die sogenannten Alu-Sequenzen beim Menschen dar (12). Außerdem sind unterschiedliche Familien von kurzen und langen, im Genom verstreuten repetitiven Sequenzen bekannt (45). Bei der Maus ist von Gebhard et al. (19) eine Familie hochrepetitiver Sequenzen charakterisiert worden, welche auch in der Nachbarschaft von Immunglobulin-Gensegmenten vorkommen ("R-Sequenzen") (48). Unsere Arbeitsgruppe konnte unlängst das Vorhandensein einer niederrepetitiven Sequenzfamilie im menschlichen Genom nachweisen, die mit den V_K -Gensegmenten des Menschen in Verbindung zu stehen scheint. Diese Sequenzen wurden als H-Sequenzen bezeichnet (B. Straubinger et al., Manuskript in Vorbereitung).

Diskutiert wird, sowohl für die R- wie auch für die H-Sequenzen, eine mögliche funktionelle Rolle beim somatischen Rekombinationsprozeß der Immunglobulin-Gensegmente. In diesem Rahmen könnte es von Interesse sein, die repetitive Sequenz in puJ-2 noch genauer einzugrenzen, um sie durch Hybridisierung und Sequenzierung genau charakterisieren und einordnen zu können. Eventuelle Ähnlichkeiten mit einer der bekannten Familien repetitiver Sequenzen des Humangenoms könnten im Hinblick auf die mögliche funktionelle Bedeutung der Sequenz aufschlußreich sein. Erste Hybridisierungsexperimente haben eine Ähnlichkeit mit den H-Sequenzen ausgeschlossen (H.-G. Klobeck, pers. Mitt.); der hochrepetitive Charakter der Sequenz würde eher für eine Alu-ähnliche Sequenz sprechen.

3.2. M13-Subklone

Verschiedene filamentöse Phagen von *Escherichia Coli* sind zu nützlichen Vektoren für die DNA-Forschung umgebaut worden (59). Darunter ist die M13-Serie von J. Messing eine der erfolgreichsten bis heute gewesen. Die M13-Vektoren haben den großen Vorteil, daß rekombinante Phagen das Enzym β -Galaktosidase nicht mehr synthetisieren können und somit unter geeigneten Bedingungen farblose Plaques ergeben, während Vektor-Plaques dunkelblau erscheinen (21). Auf Grund der Einfachheit der Prozedur, durch die man die Einzelstrangform von M13-Phagen mit einem guten Reinheitsgrad isolieren kann. (35), sind diese Vektoren das Mittel der Wahl für DNA-Sequenzierungen nach der von Sanger et al. (43) beschriebenen Methode. Die neuerdings hergestellten Phagen M13mp8 und 9, sowie M13mpl0 und 11 (36), bieten außerdem die Möglichkeit, die DNA in vorgegebener Orientierung im Vektor einzubauen, sofern es sich um ein Fragment mit verschiedenen Spaltstellen an beiden Enden handelt. Das Oligonukleotid, welches die Spaltstellen für die DNA-Insertion enthält (33-mer für M13mp8 und 9, 48-mer für M13mpl0 und 11) ist bei beiden Phagenpaaren in jeweils umgekehrter Anordnung im lacZ'-Gen eingebaut worden. Somit kann man durch die Wahl des geeigneten Vektors bestimmen, welcher Strang der einzubauenden DNA den (+)-Strang darstellen soll. Die Möglichkeit, die Orientierung eines in M13 klonierten Fragments im Voraus zu bestimmen, ist auch für die Herstellung von einzelstrang-spezifischen Hybridisierungsproben, sowie für "in vitro"-Mutagenese von Nutzen (36).

Ein Nachteil der M13-Phagen gegenüber anderen Vektoren, wie z.B. pBR322, besteht darin, daß eingebaute Fragmente länger als 2 kb instabil sind und oft vom Vektor deletiert werden (3). Allerdings ist gerade die Abwesenheit von pBR322-spezifischen Sequenzen in M13-Klonen bei vielen Hybridisierungsexperimenten von Vorteil bzw. macht ihre Durchführung erst möglich.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten M13mpl0-Subklone wurden z.T. schon innerhalb der Arbeitsgruppe als Hybridisierungsproben für Chromatinstudien verwendet. Der Klon puJ-2 konnte auf Grund der dort vorhandenen repetitiven Sequenz nicht zu diesem Zweck verwendet werden; der Klon muJ-3, welcher die ersten 1,4 kb (von 5' nach 3') von pJ-1 enthält, besitzt wie gezeigt keinen hochrepetitiven Anteil und käme daher für diese Studien in Frage. Erste Hybridisierungsexperimente lassen allerdings das Vorkommen einer niederrepetitiven Sequenz auf diesem Klon vermuten, dessen Bedeutung noch unklar ist (V. Pospelov, pers. Mitt.).

Falls sich während der Untersuchungen die Sequenzierung bestimmter Abschnitte von pJ-1 als notwendig erweisen sollte, können die bereitgestellten M13-Subklone als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Einzelstrang-DNA zur Bestimmung der DNA-Sequenz dienen.

3.3. Die menschliche J_K-C_K-Region in der Keimbahnordnung

Wie eingangs erwähnt, ist das 10,6 kb lange BamHI-Fragment mit den fünf J_K- und dem C_K-Gensegment des Menschen erstmals von P. Leder und Mitarbeitern (22) beschrieben worden. Dieselbe Gruppe hat daraufhin sowohl die J_K- wie auch die C_K-Region sequenziert (22, 23). Dabei sind in der unmittelbaren Nachbarschaft der kodierenden J_K-Sequenzen Nukleotidabfolgen festgestellt worden, denen mit großer Wahrscheinlichkeit eine Signalfunktion im somatischen Rekombinationsprozeß zugesprochen werden muß. Daß allerdings auch den kodierenden Sequenzen entferntere DNA-Abschnitte durchaus von Interesse sein können, hat neuerdings eine Arbeit von Emorine et al. (17) gezeigt. Es handelt sich dabei um eine hochkonservierte Sequenz im großen Intron zwischen J_K-5 und C_K. Die Homologie in diesem Stück ist zwischen Maus, Kaninchen und Mensch höher als die zwischen den C_K-Genen der gleichen Arten. Diskutiert wird eine mögliche Rolle dieser Sequenz als Kontrollelement der Trans-

kription ("enhancer element").

Neben den kodierenden Abschnitten sind aus diesen Gründen auch die flankierenden Sequenzen der menschlichen J_K-C_K -Region in der Keimbahnanordnung von Interesse, u.a. auch im Hinblick auf ein besseres Verständnis des somatischen Rekombinationsprozesses der Immunglobulin-Gensegmente.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Reagenzien und Enzyme

Sämtliche anorganische Reagenzien (Natriumchlorid, Cäsiumchlorid, Tris, EDTA, SDS) sowie Glukose, Saccharose, Hefeextrakt und Ethidiumbromid wurden von E. Merck, Darmstadt, Ficoll 400, Sephacryl S 1000 und Sephadex G50 von Pharmacia (Schweden) bezogen. Bactoagar und Bactotrypton stammten von Difco, Michigan. Polyvinylpyrrolidon (PVP), Rinderserumalbumin (BSA) wie auch IPTG und X-Gal lieferte Sigma GmbH, München. Für die Endmarkierung (s. 4.2.2.) wurde $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ von New England Nuclear (NEN) verwendet. Sea Kem Agarose und Seaplaque Agarose waren von Marine Colloids, Rockland, U.S.A..

Folgende Enzyme wurden verwendet:

Restriktionsnukleasen: AluI, BamHI, ClaI, EcoRI, HpaII, HphI, HindII, HindIII, PstI, PvuII, SacI, Sau3AI, TaqI (Boehringer Mannheim); AccI, HincII, HinfI, Sau96I (New England Biolabs, Beverly, M.A.); SstI (Bethesda Research Laboratories). BspRI wurde von S. Notz nach (20) isoliert.

Nach (37) isolierte S. Notz T4-DNA Ligase aus T4-infizierten Escherichia Coli-Zellen. DNA Polymerase I (großes Fragment nach Klenow) und T4-Polynukleotidkinase wurden von Boehringer Mannheim, Lysozym von Serva, Heidelberg, bezogen.

4.1.2. Bakterien, Phagen und Nukleinsäuren

Den Bakterienstamm Escherichia Coli JM103 ($\Delta\text{lac pro}$, thi , strA , supE , endA , sbc B15 , hsd R4 , $\text{F}'\text{'tra D36}$, pro AB , lac I^q , ZAM15) lieferte P.L. Biochemicals, Milwaukee, U.S.A.. Lachsspermien-DNA stammte von Sigma GmbH, München. Der von Messing und Vieira (36)

konstruierte Escherichia Coli-Phage M13mpl0 wurde von J. Messing zur Verfügung gestellt und von G. Combriato präparativ aufbereitet. Die radioaktiv markierte Gesamt-DNA aus menschlicher Plazenta zur Hybridisierung kam von H.-G. Klobeck.

4.2. Methoden

4.2.1. Restriktionsspaltungen

Die Restriktionsspaltungen der Subklone pJ-1 und puJ-2 wurden nach (24, 50) durchgeführt. Dabei wurde jeweils 1 µg DNA mit einem leichten Überschuß an Nuklease während 2 Stunden bei 37°C, mit TaqI bei 65°C, inkubiert. Dabei wurde ein Universalspaltpuffer folgender Zusammensetzung verwendet: 10 mM Tris-HCl pH=7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM Mercaptoäthanol, 50 mM NaCl. Für die Partialsplattungen siehe Legende zu Abb. 7.

4.2.2. Radioaktive Endmarkierung

Die partielle Auffüllung der 5'-überhängenden DNA-Enden vom Subklon puJ-2 nach der ClaI-Spaltung (2.3.) wurde wie folgt durchgeführt: Die Menge an DNA wurde ausgehend von der optischen Dichte berechnet. Daraufhin wurde eine äquimolare Menge bezüglich der Enden (d.h. 1 µM Plasmid = 2 µM Enden) von [α -³²P]dCTP dazugegeben und das Reaktionsgemisch mit 1 µl (5 U) DNA Polymerase I (großes Fragment nach Klenow) für 5 min bei 16°C inkubiert. Verwendet wurde folgender Puffer: 50 mM Tris-HCl pH=7,8, 5 mM MgCl₂, 10 mM β -Mercaptoäthanol. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA ad 5 mM gestoppt. Nach der Fraktionierung durch eine Sephadex G50-Säule wurde MgCl₂ ad 10 mM dazugegeben, um die Spaltung mit EcoRI zu ermöglichen.

4.2.3. Herstellung des Marker-Gemisches

Das Marker-Gemisch wurde von G. Combriato zur Verfügung gestellt.

Für die Herstellung des Marker-Gemisches wurde pBR322-DNA verwendet, welche mit folgenden Enzymen bzw. Enzymkombinationen in getrennten Ansätzen gespalten wurde: EcoRI, EcoRI/PstI, BamHI/PstI, EcoRI/PvuII, BamHI/PvuII, AluI. Nach elektrophoretischer Kontrolle der Spaltungen und Abschätzung der Bandenintensität wurden die Ansätze vereinigt. Dabei wurden die Proportionen so gewählt, daß alle Fragmente nach Anfärbung mit Ethidiumbromid ungefähr die gleiche Intensität aufweisen. Die DNA-Konzentration des Marker-Gemisches beträgt etwa 0,2 µg/µl. Pro Agarosegel wird auf zwei bis drei Taschen jeweils 1 µg Marker-Gemisch aufgetragen.

Ansatz	Fragmentlänge	Bezeichnung in Abb. 3
EcoRI	4362 Bp	A
EcoRI/PstI	3610 Bp	B
BamHI/PstI	3233 Bp	C
BamHI/PvuII	2672 Bp	D
EcoRI/PvuII	2295 Bp	E
EcoRI/PvuII	2067 Bp	F
BamHI/PvuII	1690 Bp	G
BamHI/PstI	1129 Bp	H
AluI	910 Bp	I
EcoRI/PstI	752 Bp	K
AluI	661 Bp	L
AluI	521 Bp	M
AluI	403 Bp	N
AluI	281 Bp	O
AluI	257 Bp	P
AluI	226 Bp	Q
AluI	136 Bp	R
AluI	100 Bp	S

Tabelle 1: Spaltprodukte für den Marker-Gemisch aus pBR322-DNA.

4.2.4. Agarosegel-elektrophorese

Die Gelelektrophoresen in Agarose wurden nach (1) durchgeführt. Für diese Gele (1-2% Agarose) wurde ein Tris-Acetat-EDTA Puffer nach Loening (29) benutzt. Puffer und Gele enthielten 1 µg/ml Ethidiumbromid. Die Reaktionsgemische wurden mit 1/10 Volumen 50%-iger Saccharose und etwas Bromphenolblau versetzt und auf dem Agarosevertikalgel aufgetragen. Nach etwa 2,5 Stunden Elektrophorese bei 95 V wurden die Gele unter UV-Licht photographiert.

4.2.5. Southerntransfer und Filterhybridisierung

Nach der von E.M. Southern (47) beschriebenen Methode wurden die in Agarosegelen aufgetrennten DNA-Fragmente auf Nitrozellulose (BA 85, Schleicher und Schüll) transferiert. Gesamt-DNA aus menschlicher Plazenta wurde von H.-G. Klobeck nach (39) durch "Nicktranslation" radioaktiv markiert. Die Nitrozellulose-Filter wurden 3 Stunden bei 80°C im Vakuumofen gebacken. Die Hybridisierung nach (27) mit der nicktranslatierten Plazenta-DNA wurde in folgender Weise modifiziert: Nach kurzem Eintauchen in einer Lösung von 2x SSC bei Raumtemperatur wurden die Filter 3 Stunden bei 68°C in 6x SSC gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte für 1 Stunde in 6x SSC und 1x Denhardt-Lösung (13) bei 68°C unter Zusatz von 50 µg/ml Lachsspermien-DNA. Letztere war durch zehnminütiges Erhitzen bei 100°C denaturiert und durch Beschallung gesichert worden. 4 ml der Prähybridisierungslösung wurden für das Hybridisieren aufgehoben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C in einer Rotationsvorrichtung. Es wurden 50 ng/ml der nicktranslatierten und ebenfalls hitzedenaturierten Probe verwendet. Anschließend wurden die Filter mit 2x SSC bei Raumtemperatur abgespült und jeweils halbstündig bei 68°C mit folgenden Lösungen, in der Reihenfolge, gewaschen: 6x SSC, 1x Denhardt-Lösung; 4x SSC, 0,5% SDS; 2x SSC, 0,5% SDS; 2x SSC, 0,5% SDS; 2x SSC. Nach der Trocknung erfolgte die

Autoradiographie der Filter bei -80°C mit Kodak X-Omat XR5-Filmen und SE6 Cawo-Verstärkerfolien über Nacht.

4.2.6. Transformation und Transfektion

Die Subklonierung der drei Fragmente aus dem pCK19-Klon pJ-1 erfolgte wie unter 2.5. beschrieben. Die logarithmisch wachsenden (OD_{550} 0,4-0,5) JM103-Bakterienzellen wurden durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem 50 mM Kalziumchlorid kompetent gemacht und zehnfach konzentriert. 300 μl kompetenter Zellen wurden zu 2-3 μg Äthanolgefällter DNA zur Transfektion gegeben, und das Gemisch 40 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (5 min bei 37°C) wurden die Zellen zusammen mit 0,2 ml nicht-kompetenter, logarithmisch wachsender (OD_{550} 0,4-0,5) JM103-Bakterien unter Zugabe von 10 μl IPTG und 50 μl X-Gal ausplattiert. Da die Zahl der Transformanten nicht im Voraus abzuschätzen ist, wurden die Bakterien in 4 Schalen mit folgenden Volumina an Transfektionsgemisch ausplattiert: 1 μl , 5 μl , 50 μl , 244 μl .

Klone, bei denen durch Einbau von Fremd-DNA das lacZ'-Gen inaktiviert wurde. (21), bilden farblose Plaques gegenüber den blauen Plaques, welche durch Transfektion des nativen M13mp10 entstehen. Zwölf farblose Plaques wurden in jeweils 5 ml einer logarithmisch wachsenden JM103-Kultur suspendiert und 5-6 Stunden bei 37°C geschüttelt. Aus den infizierten Zellen wurde nach Zentrifugation und Abtrennung des Phagenüberstandes (welcher bei 4°C aufbewahrt wurde) nach (5) ein klares Lysat erhalten und durch Restriktions-spaltung getestet. Dadurch wurden diejenigen Klone ermittelt, welche ein DNA-Fragment der erwarteten Größe enthielten. Für die Anzucht der Klon-DNA wurde 1 ml des Phagenüberstandes zur Infektion von 800 ml einer logarithmisch wachsenden JM103-Bakterienkultur verwendet. Nach 6-7 Stunden Schütteln bei 37°C wurde die doppelsträngige RF-Phagen-DNA in folgender Modifikation nach (53) iso-

liert (G. Combriato, pers. Mitt.): Nach der Zugabe von EDTA werden pro Liter Ansatz 16 ml Detergenzmixtur (1% Brij, 62,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH=8,0, Deoxycholat ad 0,4%) zugesetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellbestandteile und die membran-gebundene Escherichia Coli-DNA werden abzentrifugiert und der Überstand durch Schütteln mit Chloroform und einem 4:1 Chloroform: Butanol-Gemisch, welche jeweils abzentrifugiert werden, weiter gereinigt. Nach einer Äthanol-fällung erfolgt die Auftrennung mittels eines Cäsiumchlorid-Gradienten. Die untere Bande wird unter UV-Licht mit einer Kanüle abgenommen und durch dreimaliges Schütteln mit einem CsCl-gesättigten 1:1 Butanol:Isopropanol-Gemisch das Ethidiumbromid entfernt. Das Cäsiumchlorid wird durch Dialysieren gegen einen Tris-EDTA-Puffer (1 mM Tris-HCl pH=8,0, 0,1 mM EDTA) entfernt und der Klon nach zweimaliger Äthanol-fällung mittels Restriktionsspaltungen überprüft.

4.3. Biologische Sicherheit

Sämtliche Experimente, in denen Bakterien durch Human-DNA transformiert wurden, wie auch die Charakterisierung und Aufbewahrung solcher Bakterien, sind unter L2/B1-Bedingungen entsprechend den " Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren " (4. überarbeitete Fassung des Bundesministeriums für Forschung und Technologie, August 1981) durchgeführt worden.

5. Zusammenfassung

Ein Ziel der Arbeitsgruppe war es, die Struktur und die Umlagerungen des Locus für die leichten Immunglobulin-Ketten vom κ -Typ beim Menschen aufzuklären.

Im Rahmen dieses Projektes wurde zunächst ein 6,4 kb langer Subklon, der die fünf menschlichen J_{κ} -Gensegmente in der Keimbahn-anordnung enthält, mit vier Restriktionsnukleasen kartiert, welche eine Hexanukleotid-Erkennungssequenz aufweisen. Die ermittelten Spaltstellen dieser Nukleasen konnten z.T. für Subklonierungsversuche mit den Vektoren pBR322 bzw. M13mpl0 verwendet werden.

Erste Hybridisierungsversuche hatten ergeben, daß sich im 5'-Bereich der J_{κ} -Genflanke, etwa 0,6 bis 3,1 kb 5'-seitig von J_{κ} -1, eine repetitive Sequenz befindet. Der diesen Bereich umfassende Subklon wurde mittels radioaktiver Endmarkierung unter Verwendung von Nukleasen mit Tetranukleotid-Spezifizität im einzelnen kartiert. Durch weitere Hybridisierungsversuche wurde die hochrepetitive Sequenz auf einem 1100 Bp langen Fragment, 0,6 bis 1,7 kb 5'-seitig von J_{κ} -1, eingegrenzt. Weitere Hybridisierungen und eine eventuelle Sequenzierung könnten im Hinblick auf die mögliche funktionelle Bedeutung dieser Sequenz aufschlußreich sein.

Aus dem 6,4 kb langen Klon wurden außerdem drei Subklone im Vektor M13mpl0 hergestellt. Der Subklon muJ-3 enthält ein 1,4 kb langes Stück aus der entfernten 5'-Flanke der J_{κ} -Gensegmente; er reicht von 1,7 bis 3,1 kb 5'-seitig von J_{κ} -1 und enthält keine hochrepetitive Sequenzen. Die Bedeutung einer in diesem Stück sich befindenden niederrepetitiven Sequenz (V. Pospelov, pers. Mitt.) ist noch unbekannt. Der Subklon muJ-1 enthält ein 0,62 kb langes Stück, welches das J_{κ} -1-Gen direkt 5'-seitig flankiert. Der Subklon mJ-2 enthält ein 1,85 kb langes Stück, das die fünf

menschlichen J_K -Gensegmente sowie 0,52 kb 3'-seitig von J_K -5 umfaßt. Diese Klone wurden z.T. schon für Chromatinstudien innerhalb der Arbeitsgruppe verwendet. Sie können auch als Ausgangsmaterial für die von Sanger et al. (43) beschriebene Sequenzierungsmethode benutzt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Aaij, C. und Borst, P. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 269, 192-200
2. Baltimore, D. (1981) *Cell* 26, 295-296
3. Barnes, W.M. (1980) in *Genetic Engineering*, Vol. II (Hrsg. Setlow, J. und Hollaender, A.), pp.185-200 (Plenum Publishing Co., New York)
4. Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1981) *Cell* 24, 613-623
5. Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523
6. Bolivar, E., Rodriguez, R.L., Green, P.J., Behach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, A.W., Cross, J.H. und Falkow, S. (1977) *Gene* 2, 95-113
7. Bothwell, A.L.M., Paskind, M., Reth, M., Imanishi-Kari, T., Rajewsky, K. und Baltimore, D. (1981) *Cell* 24, 625-637
8. Brack, C., Hiram, M., Lenhard-Schuller, R. und Tonegawa, S. (1978) *Cell* 15, 1-14
9. Cory, S., Tyler, B.M. und Adams, J.M. (1981) *J. Mol. Appl. Genetic* 1, 103-116
10. Croce, M.C., Shander, M., Martinis, J., Cicurel, L., D'Ancona, G.G., Dolby, T.W. und Koprowsky, H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3416-3419
11. Davis, M.M., Calame, K., Early, P.W., Livant, D.L., Joko, R., Weissman, I.L. und Hood, L. (1980) *Nature* 283, 733-739
12. Deininger, P.L., Jolly, D.J., Rubin, C.M., Friedmann, T. und Schmid, C.W. (1981) *J. Mol. Biol.* 151, 17-33
13. Denhardt, D.T. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23, 641-646
14. Dreyer, W.J. und Bennett, J.C. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 864-869
15. Early, P.W., Davis, M.M., Kaback, D.B., Davidson, N. und Hood, L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 857-861

16. Early, P.W., Huang, H., Davis, M.M., Calame, K. und Hood, L. (1980) Cell 19, 981-992
17. Emorine, L., Kuehl, M., Weir, L., Leder, P. und Max, E.E. (1983) Nature 304, 447-449
18. Erikson, J., Martinis, J. und Croce, C.M. (1981) Nature 294, 173-175
19. Gebhard, W., Meitinger, T., Höchtel, J. und Zachau, H.G. (1982) J. Mol. Biol. 157, 453-471
20. Greene, P.J., Heynecker, H.L., Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Covarrubias, A.A., Backman, K., Russell, D.J., Tait, R. und Boyer, H.W. (1978) Nucl. Acids Res. 5, 2373-2380
21. Gronenborn, B. und Messing, J. (1978) Nature 272, 375-377
22. Hieter, P.A., Max, E.E., Seidman, J.G., Maizel, J.V. und Leder, P. (1980) Cell 22, 197-207
23. Hieter, P.A., Maizel, J.V. und Leder, P. (1982) J. Biol. Chem. 257, 1516-1522
24. Hörz, W. und Zachau, H.G. (1977) Eur. J. Biochem. 73, 383-392
25. Honjo, T. und Kataoka, T. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2140-2144
26. Honjo, T. (1983) Ann. Rev. Imm. 1, 499-525
27. Jeffreys, A.J. und Flavell, R.A. (1977) Cell 12, 429-439
28. Klobeck, H.-G., Solomon, A.D. und Zachau, H.G. (1984) Nature 309, 73-76
29. Loening U.E. (1967) Biochem. J. 102, 251-257
30. Malcolm, S., Barton, P., Murphy, C., Ferguson-Smith, M.A., Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4957-4961
31. Marcu, K.B. und Cooper, M.D. (1982) Nature 298, 327-328
32. Max, E.E., Seidman, J.G. und Leder, P. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3450-3454
33. Max, E.E., Seidman, J.G., Miller, H. und Leder, P. (1980) Cell 21, 793-799

34. McBride, O.W., Hieter, P.A., Hollis, G.F., Swan, D., Otey, M.C. und Leder, P. (1982) *J. Exp. Med.* 155, 1480-1490
35. Messing, J., Crea, R. und Seeburg, P.H. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9, 309-321
36. Messing, J. und Vieira, J. (1982) *Gene* 19, 269-276
37. Murray, N.E., Bruce, S.A. und Murray, K. (1979) *J. Mol. Biol.* 132, 493-505
38. Pech, M., Höchtl, J., Schnell, H. und Zachau, H.G. (1981) *Nature* 291, 668-670
39. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977) *J. Mol. Biol.* 113, 237-251
40. Russel, G.J., Walker, P.M.B., Elton, R.A. und Subak-Sharpe, J.M. (1976) *J. Mol. Biol.* 108, 1-23
41. Sakano, H., Hüppi, K., Heinrich, G. und Tonegawa, S. (1979) *Nature* 280, 288-294
42. Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W. und Tonegawa, S. (1980) *Nature* 286, 676-683
43. Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H. und Roe, B.A. (1980) *J. Mol. Biol.* 143, 161-178
44. Seidman, J.G., Max, E.E. und Leder, P. (1979) *Nature* 280, 370-375
45. Singer, M.F. (1982) *Cell* 28, 433-434
46. Smith, H.O. und Birnstiel, M.L. (1976) *Nucl. Acids Res.* 3, 2387-2399
47. Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503-527
48. Steinmetz, M., Höchtl, J., Schnell, H., Gebhard, W. und Zachau, H.G. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8, 1721-1729
49. Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H. und Wells, J.V. (1982) *Basic and Clinical Immunology*, S.46 (Lange Medical Publications, Los Altos, California)
50. Streeck, R.E. und Hobom, G. (1975) *Eur. J. Biochem.* 57, 595-606

51. Sutcliffe, J.G. (1978) Nucl. Acids Res. 5, 2721-2728
52. Sutcliffe, J.G. (1979) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90
53. Tanaka, T. und Weisblum, B. (1975) J. Bacteriology 121, 354-364
54. Tonegawa, S. (1983) Nature 302, 575-581
55. Valbuena, O., Marcu, K.B., Weigert, M. und Perry, R.P. (1978) Nature 276, 780-784
56. Weigert, M., Perry, R.P. und Kelley, O.; Hunkapillar, T., Schilling, J. und Hood, L. (1980) Nature 283, 497-499
57. Williamson, A.R. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 467-500
58. Zeelon, E.P., Bothwell, A.L.M., Kantor, F. und Schechter, I. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 3809-3820
59. Zinder, N.D. und Boeke, J.D. (1982) Gene 19, 1-10

7. Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	In α -Stellung radioaktiv markiertes Desoxycytidin-triphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
C	Constant (Immunglobulin-Gensegment)
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GC-Gehalt	Relativer Anteil an Guanin-Cytosin-Basenpaare in der DNA
H-Ketten	schwere (heavy) Immunglobulin-Ketten
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
J	Joining (Immunglobulin-Gensegment)
κ	leichte Immunglobulin-Ketten - Typ
kb, kBp	1000 Basenpaare
λ	leichte Immunglobulin-Ketten - Typ
L-Ketten	leichte (light) Immunglobulin-Ketten
min	Minuten
OD_{550}	Optische Dichte bei 550 nm
RF	Replicative form
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSC	saline sodium citrate (150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat)
U	Enzymaktivitätseinheit
V	Variable (Immunglobulin-Gensegment)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-galaktopyranosid

Lebenslauf

Name: Gian Domenico Borasio

Geboren: 9. Juli 1962 in Novara (Italien)

Eltern: Gian Pietro Borasio, geb. 30.11.1933
Mariella Gregotti Borasio, geb. 10.7.1939

Staatsangehörigkeit: Italiener

Schule: 1968 - 1980 Deutsche Schule Mailand

Allgemeine
Hochschulreife: 27. Mai 1980

Studium der
Humanmedizin: 1980 - 1986 Ludwig-Maximilians-
Universität München

Dissertation: 1982 - 1983 am Institut für Physiologische
Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie der Universität
München

Ärztliche Prüfung: 21. und 30. Oktober 1986

Approbation: 13. November 1986

